Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 203- 217

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۱۷-۲۰۳

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Investigation on the chemical composition, bioactive functional groups, antioxidant potential and cell toxicity (HT29) of Shirazi thyme essential oil: A study in laboratory scale

Elnaz Saffari Samani[1], Hossein Jooyandeh[2*], Behrooz Alizadeh Behbahani[3]

Received: 2020.09.29
Accepted: 2020.12.23

How to cite this article:
Saffari Samani, E., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B. (2022). Investigation on the chemical composition, bioactive functional groups, antioxidant potential and cell toxicity (HT29) of Shirazi thyme essential oil: A study in laboratory scale. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 203-217.

Abstract

Introduction: Shirazi thyme is a perennial herbaceous plant related to Lamiaceae family growing in central and southern regions of Iran. This study aimed to assess chemical composition, bioactive functional groups, antioxidant potential, total phenol, and total flavonoids of Shirazi thyme essential oil (STEO) and also to evaluate its cell toxicity effect against the colorectal cancer cell line (HT29).

Materials and Methods: The chemical composition of STEO was identified by gas chromatography-mass spectrometry. The bioactive functional groups of STEO were measured by Fourier transform infrared at spectra range of 500- 4000 cm^{-1}. The total phenol and total flavonoids of STEO were determined by folin- ciocalteu and aluminum chloride colorimetric method, respectively. MMT method was performed to measure the cell toxicity of STEO against the colorectal cancer cell line (HT29). The cells were cultured on DMEM high glucose medium supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin and incubated at 37°C with 95% relative humidity and 5% CO_2 concentration. The antioxidant activity of STEO was evaluated by DPPH and ABTS free radicals scavenging assays. Duncan test at 5% probability and SPSS software (version 18) was performed to compare the means of obtained results.

Results and Discussion: Based on GC/MS spectrometry, a total of 29 constituents were identified and quantified in the STEO representing more than 99% of total constituents. Thymol with 39.3% and Carvacrol with 30% were the most constituents of STEO. The other major compound of STEO were Benzene (8.52%), γ-Terpinene (5.27%), and Caryophyllene (2.97%). The presence of peak at a wavelength of 320- 1000 cm^{-1} demonstrates O-C bound that could be related to organic compounds such as alcohols, carboxylic acids, esters, and ethers. The peaks occurred at spectral range between 2800- 3000 cm^{-1} (particularly at 2869.6 up to 2960.8 cm^{-1}) are related to the stretching mode of C-H bounds and are mostly associated with alcoholic compounds in the essence. The amount of total phenol and flavonoids of STEO were 64.05 mg gallic acid equivalent/g and 11.68 mg quercetin equivalent/g, respectively. Results obtained from antioxidant activity of STEO with DPPH and ABTS free radicals scavenging showed that by increasing of STEO, the inhibition level of free radicals was enhanced. The inhibition percent of free radicals by using DPPH and ABTS at 1000 ppm concentration were 63.69% and 64.33%, respectively. The cell toxicity results of different STEO concentrations against the cell line HT29 revealed that survival of HT29 cells at 1, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200 ppm of STEO were 100, 70.15,

1. MSc. student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
(*Corresponding Author Email: hosjooy@asnrukh.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2020.40161.0

61.19, 59.33, 38.83, 25.68, 20.65 and 12.2%. According to the results of this study, as the concentration of STEO increased, its effect on the cell line HT29 enhanced and the cell percentage viability decreased. Some antioxidant activity of STEO could be interrelated to its phenolic compounds. Based on the results of antioxidant activity, the amount of total phenol and flavonoids and the effect of STEO on cell toxicity against the cell line HT29, it seems that the use of STEO is applicable in the pharmaceutical and food industries.

Keywords: Shirazi thyme essential oil, Cell toxicity, Antioxidant activity, HT29 cell viability.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 203- 217

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۱۷-۲۰۳

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی ترکیبات شیمیایی، گروه‌های عاملی زیست‌فعال، قدرت آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی بر رده سلولیHT29: مطالعه در شرایط آزمایشگاهی

الناز صفاری سامانی[۱]- حسین جوینده[۲*]- بهروز علیزاده بهبهانی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۳

چکیده

هدف از این پژوهش شناسایی ترکیبات شیمیایی، گروه‌های عاملی زیست‌فعال، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل و فلاونوئید کل اسانس آویشن شیرازی و همچنین بررسی اثر سمیت سلولی آن بر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) بود. ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی شناسایی شد. گروه‌های عاملی زیست‌فعال اسانس آویشن شیرازی با استفاده از دستگاه FTIR در محدوده عدد موجی cm^{-1} ۵۰۰–۴۰۰۰ اندازه‌گیری شد. به‌منظور اندازه‌گیری میزان فنل کل و فلاونوئید کل اسانس آویشن شیرازی به‌ترتیب از روش‌های فولین سیوکالتو و رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید استفاده گردید. از روش MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5 diphenyltetrazolium bromide) جهت اندازه‌گیری سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی در برابر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) استفاده شد. قدرت آنتی‌کسیدانی اسانس آویشن شیرازی با استفاده از مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS بررسی گردید. ترکیب کارواکرول و تیمول به‌ترتیب با ۳۹/۳ و ۳۰ درصد بیشترین ترکیب تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی بودند. وجود پیک در عدد موجی cm^{-1} ۱۰۰۰–۳۲۰ نشان‌دهنده پیوندهای O–C است که می‌تواند مربوط به ترکیبات آلی همچون الکل‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک، استرها و اتر باشد. میزان فنل کل و فلاونوئید اسانس آویشن شیرازی به‌ترتیب ۶۴/۰۵ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم و ۱۱/۶۸ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم بود. میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد با استفاده از DPPH و ABTS در غلظت ۱۰۰۰ ppm به‌ترتیب ۶۳/۶۹ و ۶۴/۳۳ بود. با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی، تأثیر بر رده سلولی HT29 افزایش پیدا کرد و درصد زنده‌مانی آن کاهش یافت. با توجه به نتایج قدرت آنتی‌اکسیدانی، فنل و فلاونوئید کل اسانس آویشن شیرازی به نظر می رسد بتوان از گیاه آویشن شیرازی به‌عنوان نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی بهره برد.

واژه‌های کلیدی: اسانس آویشن شیرازی، سمیت سلولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، زنده‌مانی سلول‌های HT29.

مقدمه

آویشن شیرازی[۳] گیاه علفی چند ساله است که به خانواده نعناعیان تعلق دارد و در مناطق مرکزی و جنوبی ایران انتشار دارد (Amin et al., 2010). به‌صورت سنتی به‌عنوان ضدعفونی‌کننده، ضددرد و ضدنفخ مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ziaee et al., 2018) و دارای فعالیت ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Geraminezhad and Roostaei-Ali Mehr., 2018). ایمن و بی خطر بودن اسانس آویشن شیرازی توسط سازمان غذا و دارو آمریکا تصویب شده است (Dabbagh Moghaddam et al., 2019). این اسانس دارای ترکیبات فنلی (تیمول و کارواکرول) است که نقش ربایندههای رادیکال آزاد را ایفا می‌کنند (Geraminezhad and Roostaei-Ali Mehr., 2018). ترکیبات فنلی به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه گیاهی شناخته شده‌اند که از اتصال یک هسته آروماتیک و یک یا چند گروه هیدروکسیل تشکیل می‌شوند (Karaman et al., 2010). این ترکیبات به وفور در تمام قسمت‌های گیاهان توزیع شده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی دارند (Mortazaei et al., 2016) که فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها را می‌توان به ویژگی‌های ردوکس و ساختار شیمیایی آن‌ها نسبت داد (Seyedalipour et al., 2016). از رایج‌ترین ترکیبات فنلی می‌توان به اسیدهای فنلیک، توکوفرول‌ها و فلاونوئیدها اشاره کرد (Huyut et al., 2017). فلاونوئیدها از معروف‌ترین گروه

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۲- استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
(* – نویسنده مسئول: Email: hosjooy@asnrukh.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2020.40161.0
3 *Zataria multiflora* Boiss

های پلی‌فنل‌ها هستند و به گروه‌های فلاونول‌ها، فلاون‌ها، ایزوفلاون، فلاونون، فلاوانول و آنتوسیانیدین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند. طیف گسترده‌ای از فعالیت بیولوژیکی را دارند و اغلب بیوفلاونوئید خوانده می‌شوند (Brodowska., 2017). به‌صورت بالقوه به‌عنوان آنتی اکسیدان عمل می‌کنند که در واقع فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به‌دلیل ماهیت پلی‌فنلی آن‌ها است (Symonowicz & Kolanek., 2012). مصارف دارویی آن‌ها سابقه طولانی دارد و به‌عنوان داروهای ضداسپاسم و ضدالتهاب در بازار عرضه می‌شوند (Brodowska., 2017).

رادیکال‌های آزاد اتم یا مولکول‌هایی هستند که به دلیل حضور الکترون‌های جفت نشده در لایه الکترونی بسیار واکنش‌پذیر هستند و بیماری‌زایی آن‌ها تأیید شده است (Mantashlo et al., 2017). واکنش های بیوشیمیایی مختلفی در بدن، گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر ایجاد می‌کنند (Fazli et al., 2013). گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر شامل آنیون‌های سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن می‌باشند (Mantashlo et al., 2017). تنش اکسیداتیو ناشی از گونه-های اکسیژن واکنش‌پذیر منجر به آسیب DNA، اکسیداسیون پروتئین و پراکسیداسیون لیپیدها در بافت‌ها و سلول‌های زنده می‌شود که در ایجاد بسیاری از بیماری‌های مزمن از جمله بیماری‌های قلبی و عروقی، سرطان، دیابت و پیری نقش اساسی دارد (Mortazaei et al., 2016) و از طرفی تغییرات اکسیداتیو در غذاهای چرب عامل اصلی ایجادکننده بو و طعم نامطلوب محسوب می‌شود و سبب کاهش ارزش غذایی آن‌ها می‌شود (Zangiabadi et al., 2012).

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که با مهار یا به تعویق انداختن اکسیداتیو حاصل از گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر، از سلول‌های بدن در برابر آثار زیان‌بار آن‌ها محافظت می‌کنند (Salhe Abadi and Mehraban Sang Atash., 2015). اگرچه در بدن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی وجود دارد ولی باید بین رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی تعادل برقرار باشد و اگر این تعادل بهم بخورد سبب ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود (Mantashlo et al., 2017). امروزه از آنتی اکسیدان‌های سنتتیک نظیر BHT[1]و BHA[2]به‌عنوان نگهدارنده‌های شیمیایی در صنعت غذا استفاده می‌شود که مطالعات انجام شده بیانگر اثرات نامطلوب تغذیه‌ای و سرطان‌زایی آن‌ها است (Shahsavari et al., 2008). به همین دلیل استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مؤثر با سمیت کمتر می‌تواند جایگزین مناسبی باشد (Khoshsokhan et al., 2015) که ضمن بالا بردن مقاومت آنتی‌اکسیدان‌های پلاسما، سبب کاهش گرفتار شدن افراد به بیماری‌هایی مانند سرطان می‌شوند (Salhe Abadi and Mehraban Sang Atash., 2015).

سرطان بیماری پیچیده‌ای است که بعد از بیماری‌های قلبی و عروقی یکی از مهم‌ترین علل مرگ و میر در جهان است (Khazraei-Moradian et al., 2014) و در اثر تکثیر غیرطبیعی سلول‌های بدن که تمایل به جدا شدن از منشاء اصلی و متاستاز دارند ایجاد می‌شود (Yonesi et al., 2017). سرطان روده بزرگ یا سرطان کولون به‌عنوان سومین سرطان شایع در زنان و مردان مطرح می‌باشد (Khazraei-Moradian et al., 2014) که فاکتورهای ژنتیکی، سبک زندگی و عادات غذایی از جمله فاکتورهای مرتبط با شیوع این بیماری می‌باشند (Sharififar et al., 2017) و اغلب به صورت توده‌های غیرسرطانی کوچک به نام پولیپ در روده شروع می‌شوند و به تدریج سرطانی می شوند (Dalali Isfahani et al., 2013). در پژوهش‌های اخیر نشان داده شده است که ترکیبات طبیعی مانند گیاهان دارویی از طریق مکانیسم‌های مختلف می‌توانند نقش مهمی در پیشگیری و درمان سرطان داشته باشند. در واقع بهره‌گیری از گیاهان دارویی با هدف مهار فرایند تومورزایی و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی یک راهکار نوین جهت مقابله با سرطان می‌باشد که از عوارض جانبی و هزینه کمتری برخوردار است. به همین دلیل انجام مطالعات علمی به‌منظور اثبات اثر بخشی داروهای گیاهی دارای اهمیت می‌باشد (Abdalan et al., 2018; Blowman et al., 2018).

پژوهش حاضر با هدف شناسایی ترکیبات و ساختار شیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل تام، فلاونوئید تام و سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی بر رده سلولی سرطان کولون روده (HT29) انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش رادیکال آزاد DPPH[3]، ABTS[4] و محیط کشت DMEM[5] از شرکت سیگما–آلدریچ آمریکا، پرسولفات پتاسیم، معرف فولین سیوکالتو، متانول، DMSO[6] و سود از شرکت مرک آلمان، کربنات سدیم از شرکت سام چونگ کره، الکل ۹۶ درصد از شرکت زکریای جهرم و آلومینیوم تری کلراید از شرکت یونی چم تهیه شدند. تمامی مواد شیمیایی مصرفی در پژوهش حاضر دارای گرید آزمایشگاهی (خلوص بین ۹۷ تا ۹۹ درصد) بودند.

تهیه اسانس آویشن شیرازی

1 Butylated hydroxytoluene
2 Butylated hydroxyanisole
3 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
4(2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
5 Dulbecco's modified eagle medium
6 Dimethyl sulfoxide

اسانس خالص آویشن شیرازی از شرکت جوهره طعم مشهد (مشهد، خراسان رضوی) خریداری شد. لازم به ذکر است که این شرکت جهت تهیه این اسانس از روش تقطیر با بخار استفاده نموده است.

آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی

جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Agilent Technologies 7890 A، آمریکا) متصل به طیف‌سنج جرمی (Agilent Technologies 5975 C، آمریکا) استفاده شد. حجم ۱ میکرولیتر از اسانس آویشن شیرازی به دستگاه تزریق شد. این دستگاه حاوی ستون مؤیینه (Agilent Technologies Inc., HP-5 MS، آمریکا) با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر بود. تنظیمات دمایی این ستون به این صورت بود که از دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲/۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت. علاوه بر این، گاز هلیم با سرعت جریان ۱/۱ میلی‌لیتر در دقیقه و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد. شناسایی نوع ترکیبات اسانس به کمک طیف نرمال آلکان‌ها و محاسبه شاخص بازداری آن‌ها و ارجاع به کتابخانه ترکیبات طبیعی انجام شد (Alizadeh Behbahani et al., 2017).

آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

در این آزمون اسانس روغنی با پتاسیم برمید مخلوط و به دنبال آن با فشرده سازی به شکل قرص مناسب تغییر یافت. سپس طیف FTIR اسانس روغنی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر FTIR (Perkin Elmer، آمریکا) در محدوده عدد موجی $500-4000\ cm^{-1}$ با وضوح $4cm^{-1}$ ثبت شد (Alizadeh Behbahani et al., 2019).

تعیین محتوای فنل تام اسانس آویشن شیرازی

به‌منظور اندازه‌گیری میزان فنل تام اسانس آویشن شیرازی از روش فولین سیوکالتو استفاده گردید. در این روش ۱ میلی‌لیتر از اسانس آویشن شیرازی با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین که به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق شده بود به خوبی مخلوط و به مدت ۲/۵ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم (۷/۵٪) به محلول فوق اضافه و مخلوط گردید. در نهایت پس از ۱ ساعت نگهداری در تاریکی میزان جذب نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت گردید. با بهره‌گیری از منحنی استاندارد گالیک اسید میزان کل ترکیبات فنلی اسانس بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در واحد وزن اسانس گزارش شد (Mehrnia et al., 2019).

تعیین محتوای فلاونوئید تام اسانس آویشن شیرازی

جهت اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید تام اسانس آویشن شیرازی از روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید استفاده شد. ابتدا ۱ میلی‌لیتر از اسانس با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس با ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه و ۷۵ میکرولیتر نیتریت سدیم (۵٪) مخلوط گردید و به مدت ۶ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی نگهداری شد. در مرحله بعد ۱۵۰ میکرولیتر آلومینیوم تری کلراید (۱۰٪) افزوده گردید و بعد از ۵ دقیقه نگهداری در دمای اتاق و تاریکی ۱ میلی‌لیتر سود ۱ مولار به آن اضافه شد و میزان جذب آن در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت گردید. مقدار فلاونوئید کل اسانس مطابق میلی‌گرم کوئرستین بر اکی‌والان اظهار گردید (Hossain and Marinova et al., 2005; Rahman., 2011).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی

تعیین فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

جهت برآورد قدرت آنتی‌رادیکالی اسانس با استفاده از مهار رادیکال آزاد DPPH میزان ۱ میلی‌لیتر از اسانس با ۳ میلی‌لیتر از محلول DPPH متانولی ۰/۱ میلی‌مولار مخلوط گردید و بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط و تاریکی جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. متانول به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی با استفاده از معادله ۱ محاسبه و نتایج بر اساس IC50 گزارش شد (Brand-Williams et al., 1995; Jooyandeh and Haji Ebrahimi Forushani., 2019).

$$\text{درصد بازدارندگی رادیکال آزاد} = \left[\frac{\text{جذب نمونه شاهد} - \text{جذب نمونه اسانس}}{\text{جذب نمونه شاهد}}\right] \times 100 \qquad (۱)$$

تعیین فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS

در این روش ابتدا محلول ۲/۴۵ میلی‌مولار پتاسیم پرسولفات با ۷ میلی‌مولار ABTS به نسبت ۱:۱ با هم مخلوط شدند و محلول حاصل به‌منظور تولید رادیکال‌های کاتیونی ABTS مدت زمان ۱۶ ساعت در دمای اتاق و تاریکی نگهداری شد. پس از آن محلول رادیکال ABTS تا جذب ۰/۷±۰/۲ در طول موج ۷۳۴ نانومتر با استفاده از متانول رقیق شد. سپس ۳/۹ میلی لیتر محلول ABTS رقیق شده با ۰/۱ میلی‌لیتر اسانس مخلوط شد و بعد از ۶ دقیقه نگهداری در دمای اتاق جذب آن در طول موج ۷۳۴ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت و در نهایت درصد بازدارندگی نمونه از طریق معادله ۲ محاسبه گردید (Barzegar et al., 2020).

$$\text{درصد مهارکنندگی رادیکال} = \left[\frac{\text{جذب نمونه اسانس} - \text{جذب نمونه کنترل}}{\text{جذب نمونه کنترل}}\right] \times 100 \quad (۲)$$

سمیت سلولی

از روش MTT (۳-(۴، ۵-دی‌متیل تیازول ۲-ایل)- ۲، ۵-دی‌فنیل تترازولیوم برماید) [1] جهت اندازه‌گیری سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی در برابر رده سلولی HT29 (شماره سلول IBRC C10097، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران) استفاده گردید. سلول‌ها در محیط DMEM[2] حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاو و پنی‌سیلین/ استرپتومایسین کشت داده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵٪ و ۵٪ دی‌اکسیدکربن قرار گرفتند. میزان تقریباً ۱۰۰۰۰۰ سلول به هر یک از چاهک‌های ۹۶ خانه اضافه شد. سپس محیط کشت DMEM،۲۰۰ میکرولیتر سرم جنینی گاو و دوزهای مختلف اسانس آویشن شیرازی (۱، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس) به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. تکثیر سلولی با استفاده از روش MTT بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون‌گذاری به صورت زیر اندازه‌گیری شد. ۳۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر یک از چاهک‌ها افزوده شد و صفحات به مدت ۳ ساعت در انکوباتور دی‌اکسیدکربن قرار گرفتند و بعد از حذف محیط، ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (ELX 808، Bio Tek Instruments، آمریکا) ثبت گردید. با استفاده از سلول‌های کنترل منحنی زنده‌مانی سلولی رسم شد (Alizadeh Behbahani et al., 2019).

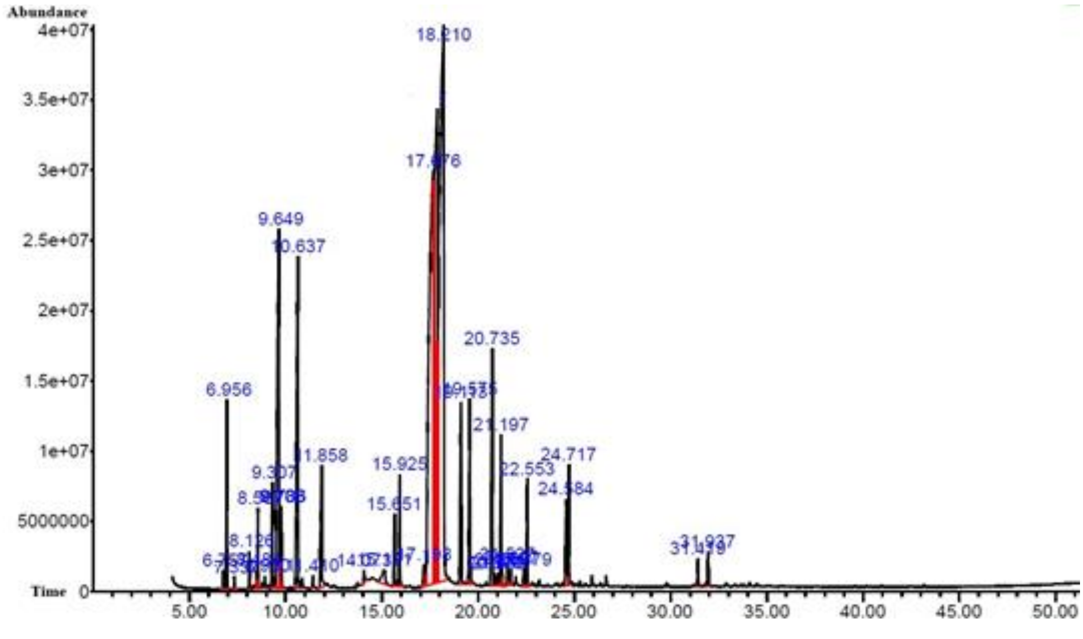
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شد. جهت مقایسه میانگین داده‌های به‌دست آمده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۸) استفاده شد. آزمون‌های اندازه‌گیری میزان فنل، فلاونوئید و قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی در ۳ مرتبه تکرار شدند.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی

نتایج حاصل از آنالیز شیمیایی اسانس آویشن شیرازی توسط کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی در جدول ۱، ذکر شده است. در شکل ۱، نمایی از کروماتوگرام آویشن شیرازی نشان داده شده است.



شکل ۱- کروماتوگرام اسانس آویشن شیرازی (محور افقی زمان (دقیقه) و محور عمودی فراوانی است).

Fig. 1. Chromatogram of Shirazi thyme essential oil (horizontal axis of time (minutes) and vertical axis of frequency).

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی

1 (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5 diphenyltetrazolium bromide)

2 Dulbecco's modified eagle medium

Table 1- Chemical composition of Shirazi thyme essential oil

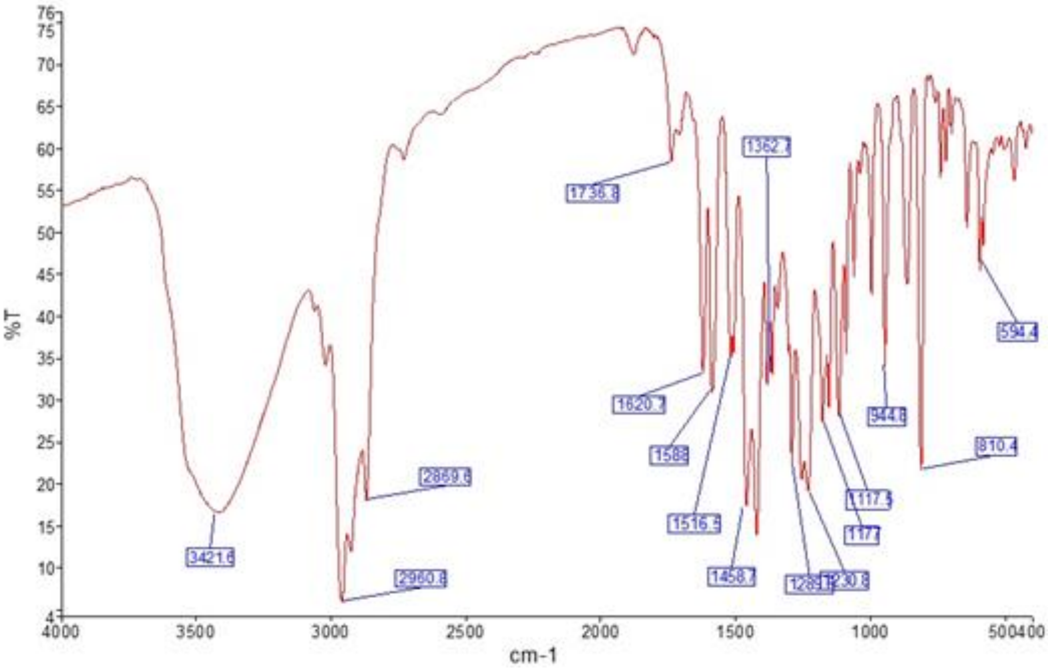
شماره NO.	ترکیبات تشکیل‌دهنده Compounds of constituent	زمان بازداری (دقیقه) Retention time (minutes)	درصد Percentage
1	α-thujene	6.75	0.13
2	α-pinene	6.95	1.46
3	Camphene	7.33	0.08
4	β-pinene	8.12	0.27
5	3-octanone	8.48	0.14
6	β-myrcene	8.56	0.63
7	Phellandrene	8.92	0.11
8	3-carene	9.31	1.05
9	Benzene	9.64	8.52
10	Limonene	9.70	0.57
11	Eucalyptol	9.78	0.51
12	γ-terpinene	10.64	5.27
13	α-terpinolene	11.41	0.08
14	Linalool	11.85	1.51
15	α-terpineol	15.11	0.58
16	Thymol	17.67	30
17	Carvacrol	18.21	39. 3
18	Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)	19.11	1.21
19	Caryophyllene	20.73	2.97
20	1H-Cyclopropa[a]naphthalene	20.87	0.12
21	Selina-3,7(11)-diene	21.05	0.12
22	Aromadendrene	21.19	1.65
23	β-selinene	21.26	0.12
24	α-humulene	21.52	0.21
25	Alloaromadendrene	21.69	0.18
26	Junipene	22.37	0.19
27	Ledene	22.55	1.05
28	Spathulenol	24.58	1.11
29	Naphthalene	24.71	1.28
کل Total			99.21

۲۹ ترکیب در اسانس آویشن شیرازی شناسایی شد که در مجموع ۹۹/۲۱٪ از اجزای تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی بود. نتایج نشان داد که ترکیب کارواکرول و تیمول به ترتیب با ۳۹/۳٪ و ۳۰٪ بیش‌ترین ترکیب تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی بودند. سایر ترکیبات عمده تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی شامل بنزن (۸/۵۲٪)، گاماترپینن (۵/۲۷٪) و کاریوفیلن (۲/۹۷٪) بود. Moshafi و همکاران (۲۰۰۷)، در مجموع ۲۵ ترکیب از اسانس با استفاده از دستگاه GC/MS شناسایی کردند. این پژوهشگران گزارش کردند که ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی شامل: تیمول ۳۷/۵۹٪، کارواکرول ۳۳/۶۵٪، پاراسیمن۷/۷۲٪، گاماترپینن ۳/۸۸٪ و بتاکاریوفیلن ۲/۰۶٪ بودند. Shahsavari و همکاران (۲۰۰۸) ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. با توجه به نتایج حاصل از دستگاه GC/MC کارواکرول ۲۶/۰۸٪، پاراسیمن ۲۰/۳۴٪ و تیمول ۱۷/۲۳٪ به‌عنوان ترکیبات غالب اسانس آویشن شیرازی شناسایی شدند. Nasiri و همکاران (۲۰۱۴)، گزارش کردند که تیمول (۵۰/۸٪)، کارواکرول (۱۴/۴٪) و پاراسیمن (۱۰/۶٪) ترکیبات اصلی اسانس آویشن شیرازی هستند. Najafpour Navaei و Mirza (۲۰۱۵)، ترکیبات شیمیایی اسانس سرشاخه‌های گلدار آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج GC/MS در مجموع ۲۷ ترکیب در تمامی نمونه‌ها شناسایی شد که دو ترکیب کارواکرول و تیمول اجزای اصلی اسانس سرشاخه-های گلدار آویشن شیرازی بودند. Mehran و همکاران (۲۰۱۶) ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. مطابق نتایج ترکیبات اصلی شناسایی شده اسانس آویشن شیرازی توسط دستگاه GC/MS عبارتنداز: کارواکرول ۵۷/۷٪، تیمول ۱۳/۴٪ و پاراسیمن ۷/۹٪ بودند. Avaei و همکاران (۲۰۱۵) ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی در خراسان را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که در مجموع ۴۳ ترکیب شناسایی شد که ترکیبات اصلی شامل: تیمول ۴۲/۴۶٪، کارواکرول ۱۶/۸۵٪، پاراسیمن ۱۰/۶۲٪، گاماترپینن ۷/۲۶٪ و آلفاپینن ۳٪ بود. Sadeghi و همکاران (۲۰۱۵) ترکیب شیمیایی اسانس آویشن شیرازی قسمت‌های مختلف

استان فارس را مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج حاصل از GC/MS در مجموع ۵۰ ترکیب فرار شناسایی شد که ترکیبات اصلی اسانس‌های آویشن شیرازی شناسایی شده شامل: لینالول ۶۹/۵۵-۹۳/۰٪، تیمول ۵۱/۳۷-۶۶/۲٪، کارواکرول ۷۸/۵۹-۳۷/۱۴٪، گاماترپینن ۳۵/۱۱-۲۸/۲٪، پاراسیمن ۹/۷-۲۳/۱٪، کارواکرول متیل اتر ۰۸/۶-۹/۰٪، آلفاپینن ۱۳/۵-۳/۱٪ و میرسن ۷۲/۲-۵۱/۰٪ بود. Ramezanian و همکاران (۲۰۱۶) ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج در مجموع ۳۹ ترکیب از اسانس آویشن شیرازی با استفاده از GC/MS شناسایی شد که ترکیبات اصلی شناسایی شده عبارتنداز: تیمول ۶۴/۵۰٪، کارواکرول ۱۶/۱۸٪، پاراسیمن ۵۹/۱۰٪، گاماترپینن ۸۲/۶٪، آلفاپینن ۹۳/۲٪، تیمول استات ۳۸/۲٪، آلفاترپینن ۳۲/۲٪، ای-کاریوفیلن ۲۴/۱٪ و میرسن ۰۷/۱٪ بود. Mahboubi و همکاران (۲۰۱۷) ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج GC/MS محدوده ترکیبات اصلی شناسایی شده چند نمونه از اسانس آویشن شیرازی شامل تیمول ۲/۴۱-۸/۲۵٪، کارواکرول ۳/۳۴-۵/۰٪، کارواکرول متیل اتر ۳/۲۸-۸/۱٪، پاراسیمن ۱/۱۲-۳/۲٪، لینالول ۵/۶-۳/۱٪، گاماترپینن ۵/۶-۹۲/۰٪ و آلفاترپینن ۱/۵-۲۶/۰٪ بود. Mojaddar Langroodi و همکاران (۲۰۱۹) ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. مطابق نتایج در مجموع ۳۶ ترکیب از اسانس آویشن شیرازی توسط دستگاه GC/MS مشخص شد که کارواکرول ۸۲/۴۶٪ به‌عنوان ترکیب اصلی معرفی گردید. Alsaraf و همکاران (۲۰۲۰) ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن عمانی را مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج GC/MS در مجموع ۱۱ ترکیب فرار از اسانس آویشن عمانی مشخص شد که کارواکرول ۲۹/۵۹٪ و گاماترپینن ۱۲/۲۹٪ به‌عنوان ترکیبات اصلی شناسایی شدند. مقایسه نتایج حاصل از پژوهش حاضر با مطالعه‌های مشابه که در بالا ذکر شدند نشان داد به طور کلی در اکثر مطالعات پیشین نیز ترکیبات کارواکرول و تیمول ترکیب اصلی تشکیل دهنده اسانس آویشن شیرازی بودند. هر چند لازم به ذکر است که درصد تشکیل دهنده اجزای اسانس آویشن شیرازی در مطالعات پیشین دارای تفاوت‌هایی می‌باشند که دلیل این امر را می‌توان به عواملی مانند شرایط آب و هوایی، محل رشد گیاه، نوع خاک، مرحله برداشت گیاه، روش خشک کردن، نحوه استحصال اسانس و... نسبت داد.

طیف FTIR اسانس آویشن شیرازی

در شکل ۲، طیف FTIR اسانس آویشن شیرازی نشان داده شده است.



شکل۲- طیف FTIR اسانس آویشن شیرازی.

Fig. 2. FTIR spectrum of Shirazi thyme essential oil.

پیک‌های موجود در ناحیه cm^{-1} ۸۵۰ – ۵۵۰ مربوط به پیوندهای کششی (C-CL) می‌باشد. محدوده بین cm^{-1} ۹۵۰- ۹۱۰ به‌ویژه پیک‌های مربوط به ناحیه cm^{-1} ۹۴۴/۸ مربوط به پیوندهای (O-H) گروه‌های کربوکسیلیک اسید می‌باشد. وجود پیک در عدد موجی

$^{-1}$۱۳۲۰cm –۱۰۰۰ نشان‌دهنده پیوندهای (O–C) می‌باشد که می‌تواند مربوط به ترکیباتی همچون الکل‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک، استرها و اتر باشد. وجود پیک در عدد موجی cm^{-1} ۱۴۶۵/۷۸– ۱۳۶۲/۷ به‌ویژه پیک موجود در عدد موجی cm^{-1} ۱۴۵۸/۷ نشان‌دهنده گروه‌های (CH_2 و CH_3) می‌باشد. محدوده بین cm^{-1} ۱۵۵۰– ۱۴۷۵ و cm^{-1} ۱۶۵۰– ۱۵۸۰ به‌ترتیب مربوط به پیوندهای (N-O) و (C-C) باشد. وجود پیک در عدد موجی cm^{-1} ۱۷۳۶/۸ نشان‌دهنده پیوندهای کتونی (C=O) می‌باشد که می‌تواند مربوط به ترکیباتی همچون آلدهیدها باشد. محدوده بین cm^{-1} ۳۰۰۰– ۲۸۰۰ به ویژه پیک‌های مربوط به ناحیه cm^{-1} ۲۸۶۹/۶ تا ۲۹۶۰/۸ مربوط به حالت‌های کششی پیوندهای (C-H) می‌باشد. که این پیک‌ها اغلب مربوط به ترکیبات الکلی موجود در اسانس می‌باشد (Cui et al., 2007; Mohammed et al., 2016). پیک‌های موجود در ناحیه cm^{-1} ۳۵۰۰– ۳۰۰۰ به‌ویژه پیک موجود در ناحیه cm^{-1} ۳۴۲۱/۶ مربوط به ارتعاشات کششی هیدروکسیل (O-H) که ممکن است مربوط به گروه‌های الکلی یا اسیدهای کربوکسیلیک باشد.

فنل کل، فلاونوئید کل و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی

میزان فنل کل و فلاونوئید اسانس آویشن شیرازی به‌ترتیب ۶۴/۰۵ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم و ۱۱/۶۸ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم بود. نتایج بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی با رادیکال های آزاد DPPH و ABTS در جدول ۲، ذکر شده است. نتایج نشان داد که میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی افزایش پیدا کرد. میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد با استفاده از DPPH و ABTS در غلظت ppm ۱۰۰۰ به‌ترتیب ۶۳/۶۹ و ۶۴/۳۳ بود. مقایسه نتایج پژوهش حاضر با مطالعات پیشین نشان داد که تفاوت‌های در میزان فنل و فلاونوئید کل و قدرت آنتی‌اکسیدانی در این مطالعه با سایر پژوهش‌های مختلف به شرایط مختلف آب و هوایی و جغرافیایی محل رشد گیاه از قبیل نوع خاک، میزان آب و ارتفاع محیط و همچنین روش‌های مختلف اندازه‌گیری و بیان نتایج این دو ترکیب وابسته می‌باشد.

Moshafi و همکاران (۲۰۰۷)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. براساس نتایج اسانس آویشن شیرازی با IC_{50} برابر ۱± ۲۲/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر توانست رادیکال DPPH را مهار کند. Mirzaee و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان ترکیبات فنلی عصاره هیدروالکلی آویشن دنایی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد محتوای فنل کل طبق روش فولین سیوکالتو برابر ۱۱/۶± ۹۷/۷ میلی‌گرم اسیدگالیک در گرم عصاره و میزان فلاونوئید کل برابر ۲/۸ ±۳۷/۵ میلی‌گرم روتین در گرم عصاره بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره با استفاده از روش ABTS برابر ۳± ۴۰۳ میکرومول ترولکس در گرم عصاره تعیین شد. Sharafati Chaleshtori و همکاران (۲۰۱۳)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج محتوای فنل کل عصاره آویشن شیرازی با استفاده از روش فولین سیوکالتو برابر ۱۱/۰۶± ۲۸۳/۴۳ میلی‌گرم در گرم معادل گالیک اسید و میزان ترکیبات فلاونوئیدی برابر ۴/۵± ۱۳۱/۲۳ میلی‌گرم در گرم معادل روتین بود.

Khoshsokhan و همکاران (۲۰۱۵)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی عصاره برخی جمعیت‌های آویشن کوهی و دنایی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد، میزان IC_{50} جمعیت‌های مختلف آویشن کوهی مطابق روش رادیکال آزاد DPPH از ۲۰/۹۸ تا ۴۸/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و میزان ترکیبات فنلی مطابق روش فولین سیوکالتو از ۴۲/۶ تا ۶۷/۶۴ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم متغیر بودند. Ahmadi و همکاران (۲۰۱۶)، تأثیر ترکیبات فنلی را بر فعالیت ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد محتوای فنلی عصاره آویشن شیرازی با استفاده از روش فولین سیوکالتو برابر ۲/۳± ۲۲۳/۵۵ میلی‌گرم در هرگرم عصاره بود. Zangiabadi و همکاران (۲۰۱۲) فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنل کل اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج محتوای فنلی اسانس آویشن شیرازی با استفاده از روش فولین سیوکالتو برابر ۲/۹± ۳۲۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر میلی‌لیتر گزارش شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با استفاده از روش DPPH برابر ۰/۰۳± ۰/۷۸ و با استفاده از روش ABTS برابر ۰/۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر حسب IC_{50} تعیین شد. Kavoosi و همکاران (۲۰۱۲) قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران گزارش کردند که قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس با استفاده از مهار رادیکال ABTS برابر ۰/۷۵± ۲/۴۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. Aliakbarlu و همکاران (۲۰۱۳) فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. مطابق نتایج محتوای فنلی برای اسانس آویشن شیرازی با استفاده از روش فولین سیوکالتو برابر با ۴۴/۸۱ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم گزارش شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی طبق روش DPPH برابر با ۸۸/۶۳٪ گزارش شد. El Abed و همکاران (۲۰۱۴) فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس گیاه *Thymus capitata* را مورد بررسی قرار دادند. براساس نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با استفاده از روش DPPH برابر ۴۴/۱۶ و با استفاده از روش ABTS برابر ۰/۴۶۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید. Kavoosi و Rabiei (۲۰۱۵) فعالیت آنتی-اکسیدانی اسانس ۶ کموتایپ از آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. مطابق نتایج محتوای فنل تام ۶ کموتایپ با استفاده از روش

فولین سیوکالتو برابر ۰/۹± ۱۴/۲، ۰/۸± ۱۲/۸، ۰/۷± ۱۱/۴، ۰/۸± ۱۱/۲، ۰/۵± ۹/۲، ۰/۷± ۹/۴ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها با استفاده از روش ABTS برابر ۰/۸± ۲/۸، ۰/۷± ۳/۱، ۰/۹± ۳/۶، ۰/۶± ۳/۸، ۰/۵± ۴/۷، ۹/۷± ۴/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برحسب IC_{50} گزارش شد. Mortazaei و همکاران (۲۰۱۶) محتوای فلاونوئیدی و فنل کل عصاره آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. مطابق نتایج محتوای فنل کل عصاره آویشن شیرازی با استفاده از روش فولین سیوکالتو برابر ۱۱/۰۶± ۲۸۳/۳۳ میلی‌گرم گالیک اسید اکی‌والان بر گرم بود. محتوای فلاونوئیدی برابر ۴/۵± ۱۳۱/۳۳ میلی‌گرم اکی‌والان روتین بر گرم گزارش شد. Geraminezhad و Roostaei-Ali Mehr (۲۰۱۸) فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فلاونوئیدی و پلی‌فنل کل اسانس آویشن شیرازی را مورد ارزیابی قرار دادند. مطابق نتایج درصد فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی مطابق روش DPPH برابر با ۰/۰۳۴± ۹۱/۴۲۴ بود. محتوای فلاونوئیدی اسانس آویشن شیرازی برابر ۰/۰۴± ۱۲/۹۸۲ میلی‌گرم کاتچین بر میلی‌لیتر گزارش شد. محتوای پلی‌فنل کل طبق روش فولین سیوکالتو برابر ۰/۰۰۳± ۲/۲۲۹ میلی‌گرم گالیک اسید بر میلی‌لیتر بود. Aljabeili و همکاران (۲۰۱۸) فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن (آویشن باغی) را مورد ارزیابی قرار دادند. طبق نتایج محتوای فنل کل اسانس با استفاده از روش فولین سیوکالتو برابر ۱/۹± ۱۷۷/۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن با استفاده از روش DPPH برابر ۶/۷± ۱۴۹/۸ میکرومول ترولکس بر گرم و با استفاده از روش ABTS برابر ۴/۹± ۱۹۲/۳ میکرومول ترولکس بر گرم تعیین گردید.

Rezzoug و همکاران (۲۰۱۹) فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره اتانولی گیاه *Thymus algeriensis Boiss* را مورد ارزیابی قرار دادند. مطابق نتایج محتوای فنل کل عصاره گیاه با استفاده از روش فولین سیوکالتو برابر ۱± ۱۲۵ و محتوای فلاونوئیدی برابر ۱± ۱۱۸ میلی‌گرم بر گرم بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره گیاه با استفاده از روش DPPH به‌ترتیب برابر ۴/۵۱± ۱/۴۳۷ و ۰/۰۱۰± ۱/۵۶۰ و با استفاده از روش ABTS به‌ترتیب برابر ۰/۲۰۳± ۰/۸۹۶۰ و ۰/۱۹۵± ۱/۷۴۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برحسب IC_{50} گزارش شد. Golkar و همکاران (۲۰۲۰) فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی آویشن شیرازی استان یزد و فارس را مورد بررسی قرار دادند که محتوای فنل کل آن‌ها با استفاده از روش فولین سیوکالتو به ترتیب برابر ۱/۳۵± ۹۸/۸۳ و ۱/۷۴± ۱۰۲/۶۷ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم و محتوای فلاونوئید کل به‌ترتیب برابر ۰/۹۱± ۴۲/۳۶ و ۲/۲۱± ۴۲/۲۱ میلی‌گرم روتین اکی‌والان بر گرم، همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها با استفاده از روش DPPH به‌ترتیب برابر ۰/۰۳± ۰/۲۴ و ۰/۰۷± ۰/۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر حسب IC_{50} گزارش گردید.

جدول ۲- فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی با رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS

Table 2- Antioxidant activity of Shirazi thyme essential oil with DPPH and ABTS free radicals

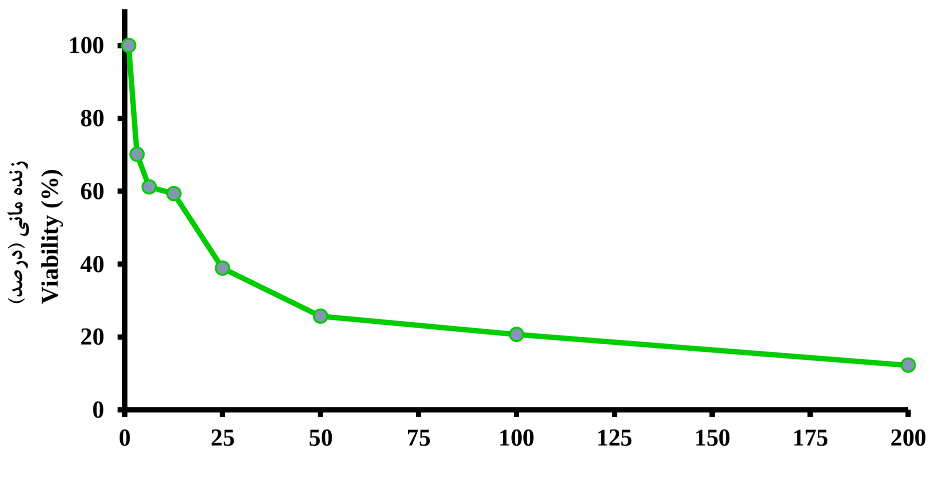
غلظت اسانس (ppm)	غلظت اسانس (ppm)	
	DPPH	ABTS
500	39.88±0.52F	37.46±0.60F
600	42.46± 0.44E	41.28± 0.49E
700	46.42± 0.67D	49.23± 0.35D
800	51.38± 0.38C	53.19± 0.28C
900	54.75± 0.55B	58.10± 0.38B
1000	63.69± 1.05A	64.33± 0.67A

حروف غیرمشابه در یک ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد است.

سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی بر رده سلول HT29

نتایج سمیت سلولی غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر رده سلولی HT29 در شکل ۳، نشان داده شده است. نتایج نشان داد که زنده‌مانی سلول‌های HT29 در غلظت‌های ۱، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب ۱۰۰، ۷۰/۱۵، ۶۱/۱۹، ۵۹/۳۳، ۳۸/۸۳، ۲۵/۶۸، ۲۰/۶۵ و ۱۲/۲ درصد بود. بر اساس نتایج مشاهده شده، با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی، تأثیر بر رده سلولی HT29 افزایش پیدا کرد و درصد زنده‌مانی آن کاهش یافت. ترکیبات فنولی اثر ضدسرطانی خود را از طریق جلوگیری از آنزیم‌های متابولیک دخیل در فعال‌سازی عوامل سرطان‌زا و یا توقف سیکل سلول سرطانی بروز می‌دهند (Abdelhady et al., 2012). Rahimifard و همکاران (۲۰۰۹)، اثر سمیت سلولی اسانس و عصاره آویشن شیرازی را بر رده سلولی اپی‌تلیال کلیه میمون سبز آفریقایی Vero و رده‌های سلولی سرطان حلق Hep2 و سرطان دهانه رحم Hela با استفاده از

روش MTT مورد بررسی قرار دادند. برحسب نتایج اسانس آویشن شیرازی در مقایسه با عصاره آن در غلظت‌های پایین‌تر اثر سمیت سلولی نشان داد. اسانس آویشن شیرازی بر رده سلول Hep2 در غلظت ppm ۰۴۶/۱۸۷۵- صفر، رده سلول Hela در غلظت ppm ۰۹۳/۳۷۵- صفر و رده سلول Vero در غلظت ppm ۰۹۳/۱۸۷۵- صفر اثر سمیت سلولی داشت. Shokrzadeh و همکاران (۲۰۱۰) اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گیاه آویشن شیرازی را بر سلول‌های عادی، رده‌های سلولی سرطان کبد HepG2 و سرطان تخمدان SKOV3 در مقایسه با سیس پلاتین مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج عصاره آویشن شیرازی در غلظت ۱۵۰ -۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با سیس پلاتین IC_{50} بالاتری را نشان داد. Janitermi و Nemati (۲۰۱۵) اثر سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی را بر رده سلولی سرطان پستان MCF-7 و سلول‌های فیبروبلاست طبیعی در غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج بیش‌ترین اثر سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی بر رده سلولی MCF-7 در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان ۴۸ ساعت مشاهده شد و مقادیر IC_{50} پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌ترتیب ۱۵۸/۹۷، ۳۰/۴۴ و ۳۶/۶۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین بیشترین اثر اسانس آویشن شیرازی بر مهار رشد سلول فیبروبلاست طبیعی در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۴۸ ساعت مشاهده شد. در پژوهش ما نیز با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی اثر سمیت سلولی به‌طور معنی‌داری در سطح ۵٪ افزایش پیدا کرد.



شکل ۳- اثر سیتوتوکسیک غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر زنده‌مانی رده سلولی HT29.

Fig. 3. Cytotoxic effect of varius concentrations of Shirazi thyme essential oil on survival of HT29 cell line.

Janitermi و همکاران (۲۰۱۵) اثر سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی را بر رده سلولی سرطان معده AGS و سلول‌های فیبروبلاست طبیعی در پلیت ۹۶ خانه با حضور و بدون حضور غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی صفر، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج اسانس آویشن شیرازی اثر مهارکنندگی قوی در برابر رده سلولی سرطان معده AGS در مقایسه با شاهد داشت و بیش‌ترین اثر سمیت سلولی اسانس مربوط به غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۹۰/۰۱٪) و زمان ۲۴ ساعت بود. همچنین بیش‌ترین اثر اسانس بر مهار رشد سلول‌های فیبروبلاست طبیعی در غلظت۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۹۸/۸۲٪) پس از ۴۸ ساعت گزارش شد. در پژوهش حاضر نیز با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی میزان سمیت سلولی نیز افزایش پیدا کرد. Sharififar و همکاران (۲۰۱۷) اثر سمیت سلولی غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه آویشن شیرازی و فراکسیون‌های آن (عصاره متانول، کلروفرم و اترپترولیوم) را بر رده‌های سلولی سرطان کلورکتال انسان SW-48 و سرطان روده بزرگ HT-29 با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار دادند. بیش‌ترین اثر سمیت سلولی بر رده سلولی HT-29 نشان داده شد. همچنین، عصاره کل آویشن شیرازی و فراکسیون اترپترولیوم اثرات سمیت سلولی را با مقادیر IC_{50} برابر ۴۴/۲۲ و ۳۳/۴۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر رده‌های سلولی SW-48 و HT-29 نشان دادند که طبق نتایج آویشن شیرازی اثر

سایکوتوکسیک مناسبی در برابر هر دو رده سلولی سرطان روده بزرگ انسان داشت. در مطالعه ما نیز اسانس آویشن شیرازی دارای سمیت سلولی مناسبی بر رده سلولی HT29 بود. Khakzad و همکاران (۲۰۱۹) اثر سیتوتوکسیک اسانس آویشن شیرازی را بر رده سلول سرطانی اریترومیلوئیدی K562 و سلول‌های نرمال PBMC در غلظت‌های صفر، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که اسانس آویشن شیرازی در حداکثر غلظت (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و زمان ۷۲ ساعت بیش‌ترین اثر سمیت سلولی را در رده سلولی K562 و سلول‌های نرمال PBMC داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که میزان فنل کل و فلاونوئید اسانس آویشن شیرازی به‌ترتیب ۶۴/۰۵ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم و ۱۱/۶۸ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم بود. نتایج نشان داد که میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی افزایش پیدا کرد. میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد با استفاده از DPPH و ABTS در غلظت ppm ۱۰۰۰ به‌ترتیب ۶۳/۶۹ و ۶۴/۳۳ بود. نتایج شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی نشان داد که ترکیب کارواکرول و تیمول به‌ترتیب با ۳۹/۳٪ و ۳۰٪ بیش‌ترین ترکیب تشکیل‌دهنده اسانس بود. بخشی از قدرت آنتی اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی را می‌توان به ترکیبات فنلی نسبت داد. نتایج نشان داد، با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی، تأثیر بر رده سلولی HT29 افزایش پیدا کرد و درصد زنده‌مانی آن کاهش یافت. با توجه به نتایج قدرت آنتی‌اکسیدانی، فنل و فلاونوئید کل اسانس آویشن شیرازی به‌نظر می‌رسد بتوان از گیاه آویشن شیرازی به‌عنوان نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی بهره برد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Abdalan, S., Baghbani-Arani, F. & Sadat Shandiz, S. A., (2018). Evaluation of Anticancer Effect of Aqueous and Hydroalcoholic Extracts of Quercusin Fectoria Leaf against Colon Cancer HT29 Cell Line. Journal of Arak University Medical Sciences, 21(4), 48-57. (In Persian)
2. Abdelhady MI, Aly HAH., 2012. Antioxidant antimicrobial activities of Callistemon comboynensis essential oil. Free Radical Antioxid, 2(1), 37-41. https://doi.org/10.5530/ax.2012.2.8
3. Aljabeili, H. S., Barakat, H. & Abdel-Rahman, H. A., (2018). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of Thyme essential oil (*Thymus vulgaris*). Food and Nutrition Sciences, 9(05), 433-446.doi: 10.4236/fns.2018.95034
4. Ahmadi, E., Abdollahi, A., Najafipour, S., Meshkibaf, M.H., Fasihi Ramandi, M., Namdar, N., Abdollahi Kheyr Abadi, S., Mousavi, S. M., Samizadeh, B. & Allahverdi, G., (2016). Surveying the Effect of the Phenol Compounds on Antibacterial Activity of Herbal Extracts: In vitro Assessment of Herbal Extracts in Fasa-Fars Province. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, 6(2), 210-220. (In Persian)
5. Aliakbarlu, J., Sadaghiani, S. K. & Mohammadi, S., (2013). Comparative evaluation of antioxidant and antifood-borne bacterial activities of essential oils from some spices commonly consumed in Iran. *Food Science and Biotechnology*, 22(6), 1487-1493. https://doi.org/10.1007/s10068-013-0242-2
6. Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F.,Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, S.A. & Mohebbi, M., (2017). Use of Plantago major seed mucilage as a novel edible coating incorporated with Anethum graveolens essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 515-526. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.055
7. Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M. & Falah, F., (2019). Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of Syzygium aromaticum essential oil on foodborne pathogens. Potravinarstvo Slovak *Journal of Food Sciences*, 13(1), 875-883.
8. Alsaraf, S., Hadi, Z., Al-Lawati, W. M., Al Lawati, A. A. & Khan, S. A., (2020). Chemical composition, in vitro antibacterial and antioxidant potential of Omani Thyme essential oil along with in silico studies of its major constituent. Journal of King Saud University-Science, 32(1),1-21. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.09.006
9. Amin, M., Kalantar, E., Mohammad-Saeid, N. & Ahsan, B., 2010. Antibacterial effect and physicochemical properties of essential oil of Zataria multiflora Boiss. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(6), 439-442.https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60105-8

10. Avaei, A., Mohamadi Sani, A. & Mahmoodzadeh Vaziri, B., (2015). Chemical composition and antimicrobial effect of the essential oil of Zataria multiflora Boiss endemic in Khorasan-Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(3), 181-185. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60649-6
11. Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B. & Mehrnia, M. A., (2020). Quality retention and shelf life extension of fresh beef using Lepidium sativum seed mucilage-based edible coating containing *Heracleum lasiopetalum* essential oil: an experimental and modeling study. Food Science and Biotechnology, 29(5), 717-728. https://doi.org/10.1007/s10068-019-00715-4
12. Blowman, K., Magalhães, M., Lemos, M., Cabral, C., Pires, I. (2018). Anticancer properties of essential oils and other natural products. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018, 3149362. https://doi.org/10.1155/2018/3149362
13. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C., (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5
14. Brodowska, K. M., (2017). Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *European Journal of Biological Research*, 7(2), 108-123.
15. Cui, S. W., Phillips, G. O., Blackwell, B. & Nikiforuk, J., (2007). Characterisation and properties of *Acacia senegal* (L.) Willd. var. senegal with enhanced properties (Acacia (sen) Supergum (TM)): Part 4. Spectroscopic characterisation of Acacia senegal var. senegal and Acacia (sen) Supergum (TM) arabic. *Food Hydrocolloids,* 21(3): 347–352.
16. Dabbagh Moghaddam, A., Kazemi, M., Movaffagh, J. & Sharifan, A., (2019). Design of Zein Electrospinning Nanofiber Packaging Containing Zataria Multiflora Essential Oil to Preserve the Ration Food. *Journal of Food Technology and Nutrition*, 16(3), 91-102. (In Persian)
17. Dalali Isfahani, L., Monajemi, R. & Amjad, L., (2013). Cytotoxic Effects of Extract and Essential oil Leaves of *Achillea wilhelmsii* C.Koch on Colon Cancers Cells. *Experimental Animal Biology*, 1(3), 1-6. (In Persian)
18. El Abed, N., Kaabi, B., Smaali, M. I., Chabbouh, M., Habibi, K., Mejri, M., Marzouki, M. N. & Ben Hadj Ahmed, S., (2014). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus capitata* essential oil with its preservative effect against Listeria monocytogenes inoculated in minced beef meat. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014. https://doi.org/10.1155/2014/152487
19. Fazli, R., Nazarnezhad, N. & Ebrahimzadeh, M., (2013). Evaluation of the Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents of Beech, Hornbeam and Poplar Barks. Journal of Forest and Wood Products, 66(3), 339-349. (In Persian)
20. Geraminezhad, F. & Roostaei-Ali Mehr, M., 2018. Effect of Zataria multiflora essential oil on rooster semen during storage at 4 C. Iranian Journal of Veterinary Science and Technology, 10(1), 21-26.
21. Golkar, P., Mosavat, N. & Jalali, S. A. H., (2020). Essential oils, chemical constituents, antioxidant, antibacterial and in vitro cytotoxic activity of different Thymus species and *Zataria multiflora* collected from Iran. *South African Journal of Botany*, 130, 250-258. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.12.005
22. Hossain, M. A. & Rahman, S. M. M., (2011). Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*, 44(3), 672-676. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.036
23. Huyut, Z., Beydemir, Ş. & Gülçin, İ., (2017). Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. *Biochemistry Research International*, . https://doi.org/10.1155/2017/7616791
24. Janitermi, M., Nemati, F. & Mohammadpour, G., (2015). Cytotoxic effect of Zataria multiflora on gastric cancer cell line (AGS) and normal fibroblast cells. Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi, 36(3), 1876-1884.
25. Janitermi, M. & Nemati, F., (2015). Cytotoxic effect of Zataria multiflora on breast cancer cell line (MCF-7) and normal fibroblast cells. Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi, 36(3), 1895-1904.
26. Karaman, Ş., Tütem, E., Başkan, K.S. & Apak, R., (2010). Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC–CUPRAC assay. *Journal of Food Chemistry*, 120(4), 1201-1209. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.065
27. Jooyandeh, H. & Haji Ebrahimi Forushani, Z., (2019). Extraction of polysaccharide from Pleurotus ostreatus by ultrasound and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*, 16(89), 85-100. (In Persian)
28. Kavoosi, G. & Rabiei, F., (2015). Zataria multiflora: chemical and biological diversity in the essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 27(5), 428-436. https://doi.org/10.1080/10412905.2015.1031917
29. Kavoosi, G., Purfard, A. M. & Aram, F., 2012. Radical scavenging properties of essential oils from Zataria multiflora and Ferula assafoetida. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), S1351-S1356. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60415-8
30. Khakzad, S., Rahmani, F., Hojjati, M. & Tabandeh, M.R., (2019). Anti-carcinogenic effects of *Satureja khuzistanica* and *Zataria multiflora* essential oils on K562 cell line proliferation. *Journal of Food and Bioprocess Engineering*, 2(2), 127-132.

31. Khazraei-Moradian, S., Andalib, A., Ganjalikhani-Hakemi, M., Safari, Z., Zare, A. & Kardar, G., (2014). The Effect of Protein Extract of Licorice Root in proliferation of HT-29 and CT26 Cancer Cell Lines. *Journal of Isfahan Medical School*, 32(298), 1-9. (In Persian)
32. Khoshsokhan, F., Babalar, M., Poormeidani, A. & Fatahi, M. R., (2015). Antioxidant Activity, Total Phenolics and Oil Content of Some *Thymus kotschyanus* and *Thymus daenensis* Populations. *Plant Production Technology*, 15(1), 153-162. (In Persian)
33. Mahboubi, M., Heidarytabar, R., Mahdizadeh, E. & Hosseini, H., (2017). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus species* and *Zataria multiflora* essential oils. *Agriculture and Natural Resources*, 51(5), 1-18. https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.02.001
34. Mantashlo, J., Deljoo, A. & Piri, Kh. (2017). The Study of Flavonoids and Antioxidant Power of Etanolic, Metanolic, Hydroalcholic and Etylacetatic Extracts of Branch and Stem Bark of Salix Alba. *Journal of Molecular and Cellular Research (Iranian Journal of Biology)*, 30(3), 381-391. (In Persian)
35. Mehran, M., Hosseini, H., Hatami, A., Taghizade, M. & Safaei, A., (2016). Investigation of seven species of essential oils of thyme and comparison their antioxidant properties. *Journal of Medicinal Plants*, 15(58), 134-140. (In Persian)
36. Mehrnia, M. A., Dehghan, N. & heidari, M., (2019). Effect of drying method and solvent type on antioxidant properties and chemical composition of sacred fig (*Ficus religiosa*). *Journal of Food Science and Technology*, 16(95), 27-37. (In Persian)
37. Marinova, D., Ribarova, F. & Atanassova, M., (2005). Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40(3), 255-260.
38. Mirzaee, A., Jaberi Hafashani, H. & Madani, A., (2012). Antioxidant activities, total phenols and total Flavonoids assay of *Origanurm vulgare*, *Teucrium polium* and *Thymus daensis*. *Hormozgan Medical Journal*, 15(4), 285-294. (In Persian)
39. Mohammed, K. A. K., Abdulkadhim, H. M. & Noori, S. I., (2016). Chemical composition and anti-bacterial effects of clove (*Syzygium aromaticum*) flowers. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(2), 483-489.
40. Mojaddar Langroodi, A., Tajik, H. & Mehdizadeh, T., (2019). Antibacterial and antioxidant characteristics of *Zataria multiflora* Boiss essential Oil and hydroalcoholic extract of *Rhus coriaria* L. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 6(1), 16-24.
41. Mortazaei, S., Mahmoudvand, H. & Rafieian, R., 2016. Phytochemical properties of some Iranian medicinal plants. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 9(4), 3427-3432.
42. Moshafi, M. H., Mansouri, Sh., Sharififar, F. & Khoshnoodi, M., (2007). Antibacterial and Antioxidant Effects of the Essential Oil and Extract of *Zataria Multiflora* Boiss. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 14(1), 33-43. (In Persian)
43. Najafpour Navaei, M. & Mirza, M., (2015). Essential Oil Composition of *Zataria Multiflora* Boiss. In Different Province of Iran. *Eco-phytochemical Journal of Medical Plants*, 2(4), 43-49. (In Persian)
44. Nasiri, E., Moosavi-Nasab, M., Shekarforoush, S. S. & Golmakani, M. T., (2014). The effects of *Zataria multiflora* on inhibition of polyphenoloxidase and melanosis formation in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 23(3), 109-118. (In Persian)
45. Rahimifard, N., Pakzad, S. R., Shoeibi, Sh., Hedayati, M. H., Hajimehdipour, H., Motaharinia, V., Mehrafshan, L., Javadi A. & Pirali Hamedani, M., (2009). Effects of Essential oil and Extract of *Thymus vulgaris*, *Zataria multiflora* and *Eugenia caryophilata* on Vero, Hela, HepII cell lines by MTT Assay. J*ournal of Medicinal Plants*, 8(30), 152-156. (In Persian)
46. Ramezanian, A., Azadi, M., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. & Saharkhiz, M.J., (2016). Effect of *Zataria multiflora Boiss* and *Thymus vulgaris* L. essential oils on black rot of 'Washington Navel'orange fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 112, 152-158. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.10.011
47. Rezzoug, M., Bakchiche, B., Gherib, A., Roberta, A., Guido, F., Kilincarslan, O., Mammadov, R. & Bardaweel, S. K., (2019). Chemical composition and bioactivity of essential oils and Ethanolic extracts of *Ocimum basilicum* L. and *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. from the Algerian Saharan Atlas. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 146. https://doi.org/10.1186/s12906-019-2556-y
48. Sadeghi, H., Robati, Z. & Saharkhiz, M. J., (2015). Variability in Zataria multiflora Bioss. essential oil of twelve populations from Fars province, Iran. Industrial Crops and Products, 67, 221-226. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.021
49. Salhe Abadi, S. & Mehraban Sang Atash, M., (2015). Evaluation of the antioxidant activity and total phenols, flavonoids in methanolic, dichloromethane and ethyl acetate extracts of aerial parts of *Rubia florida*. J*ournal of North Khorasan University of Medical Sciences*, 7(1), 101-112. (In Persian)

50. Seyedalipour, B., Hasani, A., Ebrahimzadeh, M. A. & Taravati, A., (2016). Antioxidant activity, total flavonoid and total phenolic contents of extracts taken from aerial parts of *Ballota platyloma* using three different methods: percolation, ultrasonic and polyphenolic fraction. *Journal of Kashan University of Medical Sciences*, 20(2), 147-156.
51. Shahsavari, N., Barzegar, M., Sahari, M. A. & Naghdi Badi, H., (2008). An Investigation on the Antioxidant Activity of Essential Oil of *Zataria multiflora* Boiss. in Soy Bean Oil. *Journal of Medicinal Plants*, 7(28), 56-68. (In Persian)
52. Sharafati Chaleshtori, R., Rafieian Kopaei, M., Rokni, N., Mortezaei, S. & Sharafati Chaleshtori, A., (2013). Antioxidant Activity of *Zataria Multiflora* Hydroalcoholic Extract and Its Antibacterial Effect on Staphylococcus Aureus. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 22(1), 88-94. (In Persian)
53. Sharififar, F., Miri-Moghaddam, M., Nematollahi-Mahani, S. N., Forootanfar, H. & Asgharian Rezee, M., (2017). Cytotoxicity effect of *Zataria multiflora* Boiss. on two human colon carcinoma cell lines. *Research Journal of Pharmacognosy*, 4(4), 65-70.
54. Shokrzadeh, M., Azadbakht, M., Ahangar, N., Naderi, H. & Saeedi Saravi, S. S., (2010). Comparison of the cytotoxic effects of Juniperus sabina and *Zataria multiflora* extracts with Taxus baccata extract and Cisplatin on normal and cancer cell lines. *Pharmacognosy Magazine*, 6(22), 102-105. DOI: 10.4103/0973-1296.62894
55. Symonowicz, M. & Kolanek, M., (2012). Flavonoids and their properties to form chelate complexes. *Biotechnology and Food Sciences*, 76(1), 35-41.
56. Yonesi, B., Mirzaie, A. & Aliasgari, E., (2017). Cytotoxicity and apoptotic effect of oxaliplatin on colon cancer cell line (HT29) and analysis of caspase 3 and caspase 9 gene expression using Real Time PCR method. *Journal of Cell and Tissue*, 8(4), 364-373. (In Persian)
57. Zangiabadi, M., Sahari, M. A., Barzegar, M. & Naghdi Badi, H., (2012). *Zataria multiflora* and *Bunium persicum* essential oils as two natural antioxidants. *Journal of Medicinal Plants*, 11(41), 8-21.
58. Ziaee, E., Razmjooei, M., Shad, E. & Eskandari, M.H., (2018). Antibacterial mechanisms of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil against Lactobacillus curvatus. *LWT-Food Science and Technology*, 87, 406-412. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.089